AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 69, №1, səh. 53-59 (2014)

Halofil Bakteriyalarda Hüceyrəxarici Lipaza və Amilaza Fermentlərinin Sintezi

Y.Y. Atakişiyeva*, K.X. İsayeva, İ.M. İmanova, Ş.Ə. Feyzullayeva

AMEA Mikrobiologiya İnstitutu, Badamdar şossesi, 40, Bakı AZ1073, Azərbaycan;
**E-mail: y.atakishiyeva@mail.ru*

Azərbaycanda Abşeron yarımadasının şoran torpaq və duz göllərindən götürülmüş nümunələrdən 9 halofil və halotolerant bakteriya ştamı ayrılmışdır. Morfoloji, fizioloji və biokimyəvi xüsusiyyətlərinə əsaslanaraq altı ştam *Halomonas* cinsinin, iki ştam *Halococcus* cinsinin və biri *Bacillus cereus* növünün nümayəndəsi kimi identifikasiya edilmişdir. Bakteriya ştamlarının hüceyrəxarici lipaza və amilaza aktivliyi öyrənilmişdir. *Bacillus cereus St9* potensial amilaza, *Halomonas St3* isə lipaza produsenti kimi seçilmişdir. *Bacillus cereus St9*-un hüceyrəxarici amilaza aktivliyi üçün uyğun şərait 50°C, pH 7,0, 0,5–1,5% NaCl; *Halomonas St 3*–ün kultura mayesinin maksimal lipaza aktivliyi üçün optimal şərait 60°C, pH 9,0 və reaksiya mühitinə əlavə edilən NaCl-un qatılığı 10% olmuşdur.

Acar sözlər: *halofil bakteriyalar, hüceyrəxarici aktivlik, lipaza, amilaza*

GİRİŞ

Böyük bir qrup təşkil edən halofil orqanizmlərə çoxalma və sağ qalma üçün mühitdə yüksək qatılıqda qeyri-üzvi duzlar, əsasən natrium xlorid duzu tələb edən birhüceyrəli heyvan, yosun və bakteriyalar daxildir. Fizioloji və qidalanma xüsusiyyətləri ilə fərqlənən halofil bakteriyalar müxtəlif filogenetik qruplara daxil edilir. Məs., *Actinobacteria* tipinə aid *Actinomycetales* sırası, *Bacteroidetes* tipindən olan *Sphingobacteriales* sırası, *Firmicutes* tipinə aid *Bacillales, Halanaerobiales* və *Natranaerobiales*; yarımtip *Proteobacteria* –dan olan *Rhodospirillales* və *Rhizobiales,* yarımtip *Proteobacteria* olan *Chromatiales, Oceanospirillales* və *Pseudomonadales*. Bu mikroorqanizmlər arasında yalnız üçü - *Halorhodospira halochloris, Halanaerobium lacusrosei* və *Natranaerobius 'grantii'* nisbətən geniş öyrənilmişdir. Göstərilmişdir ki, qeyd edilən mikroorqanizmlərin duza davamlılığı mühitin tərkibi, reaksiyası və becərilmə temperaturundan asılıdır (Bowers et al., 2008; Cayol et al., 1995; Imhoff and Trüper, 1977).

Halofil bakteriyaların ən mühüm biotexnoloji tətbiq sahələri müxtəlif hüceyrəxarici fermentlər sintez etməsi ilə əlaqədardır (Moreno et al., 2013). Bu fermentlərin tibbi-bioloji elm sahələrində və kimya sənayesində böyük tətbiq potensialı var. Onlar nəinki duza davamlılığı, həmçinin yuxarı temperatur və pH göstəricilərində də yüksək fəallığı ilə fərqlənir. Məhz bu səbəbdən son zamanlar halofil mikroorqanizmlərdə hüceyrəxarici hidrolitik fermentlərin sintezi diqqət mərkəzinə çevrilmişdir.

Sanchez-Porro və b. (2003), Rohban və b. (2009) hüceyrəxarici hidrolitik fermentlər sintez edən halofil bakteriyaların skrininqini aparmış və orta dərəcədə halofil bakteriyaların amilaza, dezoksiribonukleaza, lipaza, proteaza və s. Hüceyrəxarici hidrolitik fermentlərin potensial mənbəyi olduğunu göstərmişlər. Hidrolaza sintez edən duzlu mühitə adaptasiya olunmuş termotolerant bakteriyalar, nukleaza sintez edən *Bacillus* sp., proteaza sintez edən *Micrococcus varians*, lipaza sintez edən ekstrem halokokkus *Natronococcus sp*., amilaza sintez edən *Micrococcus sp*. və ksilanaza sintez edən ekstremal halofil arxebakteriya *Halorhabdus utahensis* geniş tədqiq edilmişdir (Mathabatha, 2010).

Təqdim olunan işin məqsədi təbii mənbələrdən halofil mikroorqanizmlərin ayrılması, hüceyrəxarici amilaza və lipaza produsentlərinin skrininqi olmuşdur.

MATERİAL VƏ METODLAR

Tədqiqat obyekti Abşeron yarımadasının duzlu gölməçələri və şoran torpaqlarından ayrılmış müxtəlif mikroorqanizmlər olmuşdur. Nümunələr su hövzəsindən 0,5 m və torpaq səthindən 0,2 m dərinlikdən aseptik olaraq götürülmüşdür. Əkindən əvvəl torpaq nümunələri xırdalanmışdır. Torpaq nümunələrinin suspenziyası müxtəlif dərəcədə durulaşdırılmış və NaCl əlavə edilmiş MH (Mueller-Hinton) mühitinə (Ventosa et al., 1989) əkilmişdir. Fərqli morfoloji quruluşu olan bakteriya koloniyaları içində çəp şəkildə eyni mühit olan sınaq şüşələrinə keçirilmişdir. MH mühitinin tərkibinə (q/l): maya ekstraktı - 10; proteaza peptonu - 5; qlükoza - 1; NaCl - 100; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 7; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 9,6; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0,36; KCl - 2; $NaHCO_3$ - 0,06 və NaBr - 0,026 daxildir. pH 7,2-dir.

Ayrılmış ştamların xarakteristikası. Seçilmiş bakteriya ştamlarının morfoloji, fizioloji və biokimyəvi xüsusiyyətləri müxtəlif standart metodlarla təyin edilmişdir: qrama görə, hərəkətliliyi, koloniyanın rəngi, IMViC testləri (Ventosa et al., 1989). Optimal böyümə temperaturu və pH, NaCl-a tolerantlıq adi üsullarla müəyyənləşdirilmişdir. Müxtəlif karbohidratların (1,0%) fermentasiyası karbohidrat əlavə edilmiş mühitdə fenol qırmızı məhlulu ilə yoxlanılmışdır. Antibiotiklərin ingibitor təsiri antibiotik çökdürülmüş disklərdən istifadə etməklə təyin edilmiş və antibiotk indeksi ilə (rezistentlik göstərilən antibiotiklərin sayının yoxlanılan antibiotiklərin sayına nisbəti) ifadə edilmişdir.

Hüceyrəxarici ferment sintez edən bakteriyaların seçilməsi. Hüceyrəxarici lipaza və amilaza sintez edən mikroorqanizmlərin skrininqi üçün ayrılmış halofil bakteriyalar aqarlaşdırılmış və uyğun substratlar əlavə edilən mühitə əkilmişdir. Kulturaların amilaza fəaliyyətini təyin etmək üçün bir litrində 10,0 q nişasta olan mühitdən istifadə edilmişdir. Mühitin turşluluq göstəricisi eksperimentin şərtlərindən asılı olaraq 7,0 - 10,0 arasında olmuşdur. İnkubasiya 30ºC-də 72 saat aparılmış, sonra üzərinə yod məhlulu tökülmüşdür. Bakteriya ştamlarının lipaza fəaliyyəti 1,0% tributirin əlavə edilmiş aqarlaşdırılmış qida mühitlərində (Petri kasalarında) təyin edilmişdir. Bu təyinatda tributirinin hidrolizi nəticəsində koloniyaların ətrafında yaranan şəffaf zonalar lipaza aktivliyini aşkar edir.

Potensial ştamlar yaranmış təmiz zonaların diametrinin koloniyanın diametrinə olan nisbətə əsasən seçilmişdir.

Fermentlərin aktivliyinin təyini. Ferment preparatlarının alınması üçün bakteriya ştamları uyğun substratlar olan mühitdə 30°C-də becərilmişdir. Tələb olunan müddətdən sonra hüceyrələr və kultura mayesi sentrifuqada 15 dəqiqə ərzində 10000 dövrə/dəqiqə sürətlə ayrılmışdır. Supernatant təmizlənməmiş ferment preparatı kimi istifadə edilmişdir.

Amilazanın təyini üçün Yamaguchi və b.-nın metodundan istifadə edilmişdir (Yamaguchi et al., 1969). Həll olan nişastanın 0,04 M fosfat buferində (pH 6,0) 2 ml 0,5%-li məhlulu 1 ml ferment preparatı ilə qarışdırılmışdır. 40°C-də müəyyən müddət inkubasiyadan sonra 0,2 ml qarışıq 5 ml 0,167 mM I_2-KI məhluluna əlavə edilmişdir. Optiki sıxlıq spektrofotometrdə 700 nm dalğa uzunluğunda ölçülmüşdür. 0,1 mq həll olan nişastanı 1 dəqiqə ərzində parçalamaq üçün tələb olunan aktivlik vahid kimi qəbul edilmişdir.

Lipazanın aktivliyi p-nitrofenol miristatdan (pNPM) substrat kimi istifadə etməklə təyin edilmişdir. Substratın 2-propanolda məhlulu son qatılq 1 mM olmaq şərti ilə reaksiya qarışığına əlavə edilmişdir. 10 dəqiqə ərzində 30°C-də inkubasiyadan sonra 0,2 ml ferment preparatı reaksiya qarışığına (pH 9,0) əlavə edilmiş, 60°C-də 20 dəqiqə saxlanılmış, daha sonra 2,0 ml Na_2CO_3 (0,25M) məhlulu ilə fermentin fəaliyyəti dayandırılmışdır. Spektrofotometrdə 410 nm dalğa uzunluğunda yaranmış p-nitrofenolun (pNP) miqdarı ölçülmüşdür. Bir dəqiqə ərzində 1 µmol pNP azad edən lipaza aktivliyi vahid kimi müəyyən edilmişdir.

Eksperimentlərdə reaksiya mühitinin pH və temperaturu məqsədə uyğun olaraq dəyişdirilmişdir.

Fermentlərin xarakteristikası. Mühitin turşuluq göstəricisinin fermentlərin aktivliyinə təsiri 0,1 M natrium asetat (pH 5,0-5,5), 0,1 M natrium fosfat (pH 6,0-7,5) və 0,1 M Tris-HCl buferlərindən (pH 8,0-10,0) istifadə etməklə pH 4,5-10,0 arasında sınaqdan keçirilmişdir. Fermentlərin aktivliyi mühitdə natrium xloridin 0-20% qatılıqlarında öyrənilmişdir. Optimal temperaturun müəyyənləşdirilməsi 30-80°C-də yerinə yetirilmişdir. Fermentlərin termiki stabilliyinin yoxlanılması üçün ferment preparatı 40-80°C-də saxlanılmış, sonra aktivliyi qiymətləndirilmişdir. Bir saat ərzində fermentin aktivliyinin 100% saxlanıldığı temperatur müəyyənləşdirilmişdir. Digər amillərin təsiri də bu qayda ilə təyin edilmişdir.

Həlledicilərə davamlılığın təyini üçün sınaq şüşələrində 3,0 ml ferment preparatı və 1,0 ml üzvi həlledici qarışdırılmışdır. Qarışıq 30ºC-də 200 dövrə/dəqiqə sürətlə 24 saat ərzində yelləndiricidə silkələndirilmiş, sonra nümunələr həlledici fazadan ayrılmış və fermentin aktivliyi ölçülmüşdür. Həlledici əlavə edilməyən ferment preparatı kontrol kimi qəbul edilmişdir.

Bütün təcrübələr üç təkrarda aparılmış, kənaraçıxmalar 5,0%-dən çox olmamışdır.

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Halofil bakteriyaların ayrılması və identifikasiyası. Duzlu gölməçə və şoran torpaq nümunələrindən 9 bakteriya ştamı ayrılmış və *St1-St9* kimi işarə edilmişdir. Standart metodlarla kulturaların morfoloji, fizioloji və biokimyəvi xarakteristikası təyin edilmişdir (Cədvəl 1). Nəticələr, *St9* istisna olmaqla, digər bakteriyaların Qrama görə mənfi, *St9* bakteriya ştamının isə Qram müsbət olduğunu göstərmişdir. Diffuziyaedici piqmentlər sintez edilməmişdir, yalnız *St9* endospor əmələ gətirmişdir. *St3* ştamının koloniyasının rəngi qırmızımtıl narıncı, digərləri isə ağ və sarı rəng arası müxtəlif çalarlarda rənglənmişdir. Duza davamlılığa görə orta dərəcədə halofil və halotolerantdırlar. Geniş intervalda pH-a davamlı olsalar da neytrofildirlər. MR-VP testləri mənfidir.

Cədvəl 2-də fenol qırmızısı əlavə edilmiş mühitdə şəkərlərin fermentasiya reaksiyalarının nəticələri və antibiotiklərə rezistenlik indeksinin göstəriciləri təqdim edilmişdir. Beləliklə, cədvəllərdə təqdim edilmiş göstəricilərə əsasən *St1, St2, St5, St6, St7, St8 Halomonas* cinsinin, *St3* və *St4 Halococcus* cinsinin, *St9* isə *Bacillus cereus* növünün ştammları kimi identifikasiya edilə bilər.

Lipaza və amilaza sintez edən bakteriyaların skrininqi. Apardığımız tədqiqatın əsas məqsədinə uyğun olaraq, halofil mikroorqanizmlərdən davamlı fermentlərin alınması üçün onlar uyğun mühitlərdə yetişdirilmişdir. Alınmış nəticələr ayrılmış mikroorqanizm kulturalarının müəyyən dərəcədə hər iki fermenti sintez etdiyini göstərmişdir. Ayrılmış halofil bakteriya ştamlarında lipaza fermentinin aktivliyinin təyini 9 bakteriya ştamının əksəriyyətinin müsbət reaksiya verdiyini göstərmiş, amilaza isə 3 bakteriya ştamında aşkar edilmişdir. Fermentativ aktivlik indeksinin təyininin nəticələrinə əsasən (təmiz sahənin diametrinin koloniyanın diametrinə nisbəti) maksimum miqdarda lipaza (*St 6, Halomonas sp.*) və maksimum miqdarda amilaza (*St. 9, Bacillus cereus*) sintez edən bakteriya ştamları sonrakı tədqiqatların obyekti kimi seçilmişdir.

B. cereus ştamının böyüməsinə və amilaza sintezinə NaCl-un qatılığının təsiri. Bu ştam NaCl əlavə edilməmiş mühitdə 5 günlük inkubasiyadan sonra da inkişaf etməmişdir. Sürətli böyümə mühitə 5,0, 10,0 və ya 15,0% NaCl əlavə edildikdən sonra alınmışdır. Bu zaman maksimum biokütlə 2-4 gün arasında toplanmışdır. Mühitə 20% NaCl əlavə edildikdə isə lag faza 3 günə kimi uzanmışdır. Tərkibində 1, 2 və ya 3 M qlükoza olan duzsuz mühitdə böyümə qeydə alınmamışdır. Beləliklə, *B. cereus* orta dərəcəli halofildir.

Tədqiq edilən bakteriya ştamı mühitə nişasta əlavə edilmədikdə, NaCl qatılığından asılı olmayaraq çox zəif amilaza aktivliyi göstərmişdir. Amilaza sintezi mühitə həll edilə bilən nişasta əlavə etdikdə yüksəlmişdir. Onun sintezi hətta 1,0% nişasta olan mühitə 0,5% qlükoza əlavə etdikdə də xeyli azalmışdır. Nəzərə çarpacaq miqdarda amilaza 5,0 və 10,0% NaCl əlavə edilmiş mühitlərdə iki günlük becərilmədən sonra alınmışdır (Şəkil 1). 4 günlük inkubasiyadan sonra 15,0% NaCl olan mühitdə amilazanın sintezi orta dərəcədə olmuşdur. 20,0% NaCl-la 5 günlük inkubasiyadan sonra bakteriyanın böyüməsi orta dərəcədə olmuş, ancaq çox az miqdarda amilaza sintez edilmişdir. Qeyd etmək lazımdır ki, bakteriya hüceyrələrindən alınan homogenatın amilaza aktivliyi ümumi amilaza aktivliyinin yalnız 0–0,5%-nə bərabər olmuşdur və bu tədqiq edilən bakteriya ştamının sintez etdiyi amilazanın hüceyrəxarici olduğunu göstərir.

NaCl duzunun, temperaturun və pH-ın amilazanın aktivliyinə təsiri. 10,0% NaCl əlavə edilmiş mühitdə 2 gün böyümüş *Bacillus cereus St9* kulturasının supernatantının amilaza fəaliyyəti NaCl-un iki qatılığında (0,5% və 10,0%), müxtəlif temperatur və pH–da yoxlanılmışdır (Cədvəl 3).

30°C-də amilazanın aktivliyi hər iki qatılıqda – yüksək və aşağı qatılıqda demək olar ki, eyni olmuşdur. Əksinə, 40°C və daha yuxarı temperaturda pH-ın 5,0-8,0 arası göstəricilərində bu fermentin aktivliyi duzun qatılığından asılı olmuşdur. pH-ın 4,0; 9,0 və 10,0 göstəricilərində isə amilaza fermentinin aktivliyi çox aşağıdır. Ümumiyyətlə, 60°C-də aktivlik çox aşağı və 70°C-də cüzi olmuşdur. Maksimum amilaza aktivliyi qeydə alınan variantlarda (pH 6, 40°C; pH 7, 50°C və pH 8, 50°C) fermentin aktivliyi və NaCl-un qatılığı arasında asılılıq daha ətraflı öyrənilmişdir (Şəkil 2). Alınmış göstəricilərə görə amilazanın maksimal fəaliyyəti üçün pH 6,0 və 40°C-də 0,5–1,5%, pH 7 və 50°C-də 1,5–2,5%, pH 8,0 və 50°C-də 1,0–3,0% NaCl tələb olunur. Lakin hər üç şəraitdə amilaza daha yüksək duz qatılıqları ilə ingibirə edilmişdir.

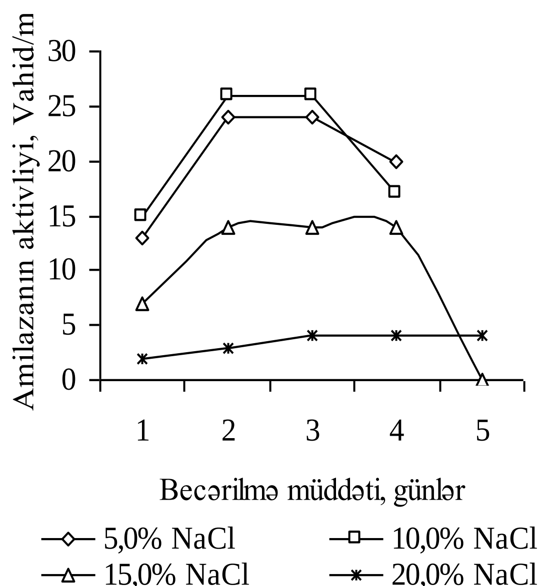
Alınmış nəticələr amilazanın duza tələbinin temperatur və pH-dan asılı olduğunu göstərir

Halomonas St.6 ştamının böyüməsinə və lipaza sintezinə NaCl-un qatılığının təsiri. Lipaza produsenti kimi secilmiş bakteriya ştamı *Halomonas St6* 1,0-20% qatılıqda NaCl olan mühitdə yaxşı böyüyür. Bu bakteriya, duzsuz mühitdə də çoxalma qabiliyyətini saxlayır. Onun optimal böyüməsi üçün mühitin pH-ı 8,0, becərilmə temperaturu 28-37°C və NaCl-un qatılığı 10,0% olmalıdır. Optimal şəraitdə böyümə zamanı lag fazanın müddəti 2 saatdır. Stasionar fazaya isə kultura 32 saatdan sonra daxil olur. Lipaza sintezi yalnız 6 saatdan sonra – eksponensial fazanın əvvəlindən sonra qeydə alınmış və 40 saatdan sonra - stasionar fazanın ortalarında maksimal göstəriciyə qalxmışdır (Şəkil 3).

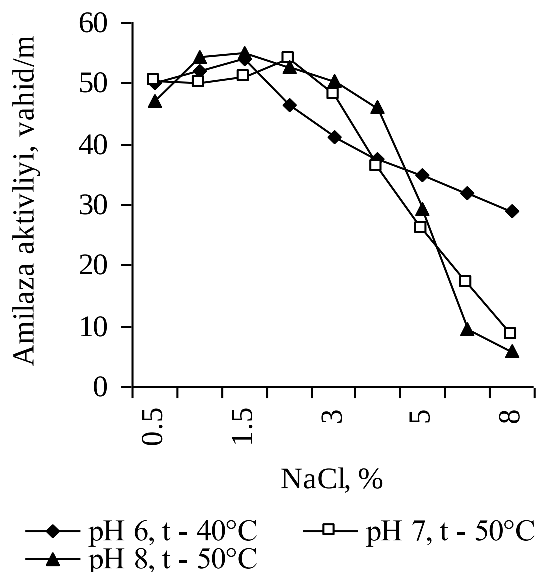
Bakteriya hüceyrələrinin lipaza aktivliyi qeydə alınan hüceyrəxarici aktivlikdən 7-8 dəfə az olmuşdur.

Cədvəl 1. Ayrılmış halofil bakteriyaların morfoloji, fizioloji və biokimyəvi xarakteristikası

Testlər	**Bakteriya ştamları**								
	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8	St 9
	Morfoloji xarakteristikası								
Koloniya- forma, rəng	dairəvi, ağ	dairəvi, krem	dairəvi, qırmızı	dairəvi, qırmızı	dairəvi, ağ	dairəvi, ağ	dairəvi, sarı	dairəvi, ağ	dairəvi, krem
Qrama görə	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hüceyrə ölçüsü, dm,və ya eni-uzu, µm	0,6-0,7 1,6-1,8	0,7-0,8 1,8-1,9	0,8-1,5	0,8-1,5	0,6-0,8 1,7-1,8	0,7-0,8 1,8-1,9	0,6-0,8 1,6-1,8	0,6-0,8 1,6-1,9	0,8-2,5
Hüceyrələrin birləş-si	Tək	Tək	Cüt	Tetrada	Tək	Tək	Tək	Tək	Tək
Endospor	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hərəkətlilik	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Fizioloji xarakteristikası								
pH həddi	5-10	5-10	5	10	5-10	5-10	5-10	5-10	4,5-9
Optimal pH	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Temperatur həddi, °C	18-45	18-45	18-45		18-45	18-45	18-45	18-45	18-45
Optimal temperatur,°C	28	28	30-37	30-35	28	28	28	28	28
NaCl-a davamlılıq, %	5-20	5-20	5-30	5-30	5-20	5-20	5-20	5-20	0-15
Optimal NaCl, %	5	5	10	8	5	5	5	5	5
	Biokimyəvi xarakteristikası								
VP testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat sərfi	-	-	-	-	-	-	-	-	+
İndol alınması	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lizindekarboksilaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Omitindekarboksilaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginindekarboksilaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenilalanindeaminaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptofandeaminaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratreduktaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G+C Mol %	60,5+0,5	60,5+0,5	61-66	61-66	60,5+0,5	60,5+0,5	60,5+0,5	60,5+0,5	35



Şəkil 1. Mühitdə olan NaCl duzunun qatılığının *Bacillus cereus St9*–un amilaza sintezinə təsiri



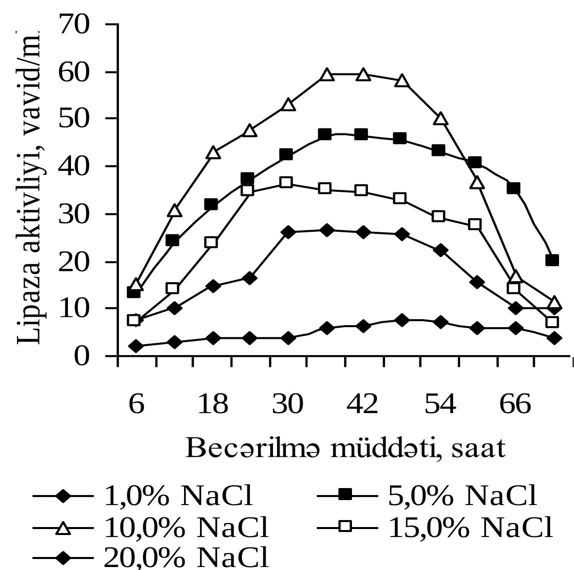
Şəkil 2. NaCl duzunun qatılığının *Bacillus cereus St9*–dan alınmış təmizlənməmiş ferment preparatının amilaza aktivliyinə təsiri.

Cədvəl 2. Şəkərlərin fermentasiya reaksiyalarının nəticələri və antibiotiklərə rezistenlik indeksinin göstəriciləri

Şəkərlər, antibiotikə davamlılıq indeksi	**Bakteriya ştamları**								
	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8	St 9
Arabinoza	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Qlükoza	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Frukroza	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Qliserin	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Qlisin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Qalaktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-inozitol	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Maltoza	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Mannoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-	+	+	+	+	+
maltotrioza	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Na-asetat	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Na-benzoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na-fumarat	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Na-suksinat	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Laktoza	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Ramnoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saxaroza	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Salisin	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Ksiloza	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Antibiotikə davamlılıq indeksi	0,42	0,41	0,92	0,93	0,40	0,40	0,42	0,40	0,85

Cədvəl 3. *Bacillus cereus St9*-dan alınmış təmizlənməmiş ferment preparatının amilaza aktivliyinə temperatur və pH-ın təsiri

pH və NaCl	**Temperatur**				
	30°C	40°C	50°C	60°C	70°C
pH 4					
0,5%	0	0	0	8	1
10%	0	0	10	1	0
pH 5					
0,5%	20	28	30	10	3
10%	22	15	7	2	0
pH 6					
0,5%	28	50	40	20	10
10%	30	27	15	5	0
pH 7					
0,5%	10	40	50	20	10
10%	19	20	7	3	0
pH 8					
0,5%	5	31	50	18	9
10%	4	15	2	1	0
pH 9					
0,5%	0	18	5	0	0
10%	0	3	0	0	0
pH10					
0,5%	0	0	0	0	0
10%	0	0	0	0	0



Şəkil 3. Müxtlif qatılıqda NaCl əlavə edilmiş mühitdə böyümüş *Halomonas St6* kulturasının hüceyrəxarici lipaza aktivliyi

NaCl duzunun, temperaturun və pH-ın lipazanın aktivliyinə təsiri. Duzun qatılığının, temperaturun, pH-ın lipaza fəaliyyətinə təsiri 10% NaCl əlavə edilmiş mühitdə 40 saatlıq inkubasiyadan sonra alınmış kultura mayesində yoxlanılmışdır. Təmizlənməmiş hüceyrəxarici lipaza fermenti preparatı kimi qəbul edilən kultura mayesi geniş temperatur intervalında lipaza fəallığı göstərmiş, 60°C-də optimal aktivlik qeydə alınmışdır (göstəricilər təqdim edilmir). Hətta 90°Cdə ferment fəaliyyətini saxlamış və onun göstəricisi optimaldan 50,0% aşağı olmuşdur.

Lipaza preparatının aktivliyi mühitin turşluluq göstəricisinin geniş diapazonunda (6,0-12,0) qeydə alınmışdır. Optimal pH-ın 9,0 olduğu aşkar edilmişdir. pH-ın 12 göstəricisində bu fermentin aktivliyinin 30 faizi saxlanılmışdır.

NaCl duzunun qatılığının lipazanın aktivliyinə təsirinin öyrənilməsi üçün reaksiya mühitinə 0; 1,0; 5,0; 10,0 və 15,0% NaCl əlavə edilmişdir. İnkubasiya temperaturu 60°C, mühitin pH göstəricisi isə 9,0 olmuşdur. Ən yüksək aktivlik 10,0% NaCl variantında alınmışdır. Duzluluq 15,0% olduqda lipazanın funksiyası təxminən 50,0%, duzsuz mühitdə isə >60,0% saxlanılmışdır.

Bu iş Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Elmin İnkişafı fondunun maliyyə yardımı ilə yerinə yetirilmişdir **– Qrant № EİF-2011-1(3)-82/53/3.**

ƏDƏBİYYAT

Bowers K., Mesbah N., Wiegel J. (2008) *Natranaerobius 'grantii' and Natranaerobius 'jonesii'*, spp. nov., two anaerobic halophilic alkaliphiles isolated from the Kenyan-Tanzanian Rift [abstract]. Abst. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. Boston, **I-007**.

Cayol J., Ollivier B., Patel B., Ageron E., Grimont P., Prensier G., Garcia J. (1995) Halanaerobium lacusroseus sp. nov., an extremely halophilic fermentative bacterium from the sediments of a hypersaline lake. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **45**:790-797.

Imhoff J., Trüper H. (1977) *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll. Arch. Microbiol., **114**:116-121.

Mathabatha E.S. (2010) Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/ halotolerant eubacteria. African Journal of Biotechnology, **9 (11)**:1555-1560.

Moreno M.L., Dolerez P., Garcia M.T., Mellado E. (2013) Halophilic Bacteria as a Source of Novel Hydrolytic Enzymes. Life. **3**: 38-51.

Rohban R., Amoozegar M.A., Ventosa A. (2009) Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **36**:333-340.

Sanchez-Porro C., Martin S., Mellado E., Ventosa A. (2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J. Appl. Microbiol.Ş **94**:295-300.

Smibert R., Krieg N. (1994) Phenotypic characterization. *In: Gerhardt P. (ed)* Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology Washington, DC, 607-654.

Ventosa A., Garcia M.T., Kamekura M., Onishi H., Ruiz-Berraquero F. (1989) *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. Syst. Appl. Microbiol., **12**:162-166.

Yamaguchi K., Matsuzaki H., Maruo B. (1969) Participation of a regulator gene in the a-amylase production of *Bacillus* subtilis. J. Gen. Appl. Microbiol., **15**:97-10.

Продукция Внеклеточной Липазы и Амилазы Галофильными Бактериями

Я.Ю. Атакишиева, К.Х. Исаева, И.М. Иманова, Ш.А. Фейзуллаева

Институт микробиологии НАНА

Из образцов, взятых из соленых водоемов и почв полуострова Абшерон в Азербайджане, изолированы 9 бактериальных штаммов. На основе морфологических, физиологических и биохимических особенностей, шесть штаммов были идентифицированы как представители рода *Halomonas*, два – как представители рода *Halococcus*, один штамм был идентифицирован как представитель *Bacillus cereus*. Бактериальные штаммы были проверены на продукцию внеклеточной липазы и амилазы. *Bacillus cereus St9* показал сравнительно высокую активность амилазы, а *Halomonas St3* – активность липазы. Активность липазы культуральной жидкости *Halomonas St3* была оптимальна при 60°C, pH 9,0 и 10% NaCl в реакционной смеси. Подходящая концентрация соли, температура и pH для максимальной активности амилазы культуральной жидкости *Bacillus cereus St9* были 0,5 – 3,0% NaCl, 50°C, pH 7,0-8,0.

Ключевые слова: *галофильные бактерии, внеклеточная активность, липаза, амилаза*

Activity of Extracellular Lipase and Amylase by Halophilic Bacteria

Y.Y. Atakishiyeva, K.Ch. Isayeva, I.M. Imanova, Sh.A. Feyzullayeva

Institute of Microbiology, ANAS

Nine halophilic amd halotolerant bacterial strains were isolated from samples obtained in saline ponds and soils of Absheron peninsula in Azerbaijan. Based on morphological, physiological and biochemical features, six strains were identified tentatively as members of the genus *Halomonas*, two isolates as *Halococcus sp.*, while one was identified as *Bacillus cereus*. Bacterial strains were screened for production of extracellular lipase and amylase. *Bacillus cereus St9* exhibited the highest amylase activity and *Halomonas St3* produced the largest amount of the lipolytic enzyme. The optimal combination of salt concentration, temperature and pH for maximum amylase activity of cultural broth from *Bacillus cereus St9* was 0.5 – 1.5% NaCl, 50°C, pH 7. The lipase activity of cultural broth of *Halomonas St3* was optimal at 60°C, pH 9.0 and 10% NaCl.

Key words: *halophilic bacteria, extracellular activity, lipase, amilase*